

**MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**

<b>(19)【発行国】</b> 日本国特許庁 (JP)	<b>(19)[ISSUING COUNTRY]</b> Japan Patent Office (JP)
<b>(12)【公報種別】</b> 公開特許公報 (A)	<b>(12)[GAZETTE CATEGORY]</b> Laid-open Kokai Patent (A)
<b>(11)【公開番号】</b> 特開平9-163983	<b>(11)[KOKAI NUMBER]</b> Unexamined Japanese Patent Heisei 9-163983
<b>(43)【公開日】</b> 平成9年(1997)6月24日	<b>(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION]</b> June 24, Heisei 9 (1997. 6.24)
<b>(54)【発明の名称】</b> アポトーシス抑制による有用物質 の効率的生産方法および細胞	<b>(54)[TITLE of the Invention]</b> EFFICIENT PRODUCTION METHOD AND CELL OF USEFUL MATTER BY APOPTOSIS INHIBITION
<b>(51)【国際特許分類第6版】</b> C12N 15/09 5/10 C12P 21/02 21/08 // A61K 39/00 39/395  (C12N 5/10 C12R 1:91 ) (C12P 21/02 C12R 1:91 )	<b>(51)[IPC Int. Cl. 6]</b> C12N 15/09 5/10 C12P 21/02 21/08 // A61K 39/00 39/395 (C12N 5/10 C12R 1:91 ) (C12P 21/02 C12R 1:91 )

**【FI】****[FI]**

C12N 15/00  
 9282-4B  
 C12P 21/02 C  
 21/08  
 A61K 39/00 A  
 H  
 39/395 A  
 D  
 C12N 5/00 B

A C12N 15/00 A 9282-4B  
 C12P 21/02 C  
 21/08  
 A61K 39/00 A  
 H  
 39/395 A  
 D  
 C12N 5/00 B

【審査請求】 未請求

[REQUEST FOR EXAMINATION] No

【請求項の数】 4

[NUMBER OF CLAIMS] 4

【出願形態】 OL

[FORM of APPLICATION] Electronic

【全頁数】 10

[NUMBER OF PAGES] 10

(21)【出願番号】

(21)[APPLICATION NUMBER]

特願平8-231124

Japanese Patent Application Heisei 8-231124

(22)【出願日】

(22)[DATE OF FILING]

平成8年(1996)8月30日

August 30, Heisei 8 (1996. 8.30)

(31)【優先権主張番号】

(31)[FOREIGN PRIORITY APPLICATION  
NUMBER]

特願平7-221953

Japanese Patent Application Heisei 7-221953

(32)【優先日】

(32)[FOREIGN PRIORITY DATE]

平7(1995)8月30日

August 30, Heisei 7 (1995. 8.30)

(33)【優先権主張国】

(33)[COUNTRY OF FOREIGN PRIORITY]  
(JP)

日本(JP)

【新規性喪失の例外の表示】

[EXCEPTION TO LOSS OF NOVELTY]

特許法第30条第1項適用申請有

Filed in application of Patent Law Section 30 (1)

り 平成7年3月1日 社団法人  
化学工学会発行の「化学工学会  
第60年会研究発表講演要旨集」  
に発表

March 1, Heisei 7 Disclosed in "Society of  
Chemical Engineers, Japan 60th annual  
convention research presentation proceedings"  
published by Society of Chemical Engineers,  
Japan.

(71)【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

000160522

[ID CODE]

000160522

【氏名又は名称】

久光製薬株式会社

[NAME OR APPELLATION]

Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

【住所又は居所】

佐賀県鳥栖市田代大官町408番  
地

[ADDRESS or DOMICILE]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

鈴木 栄二

[NAME OR APPELLATION]

Suzuki Eiji

【住所又は居所】

東京都文京区弥生2-4-11

[ADDRESS or DOMICILE]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

湯田 和洋

[NAME OR APPELLATION]

Yuda Kazuhiro

【住所又は居所】

茨城県つくば市観音台1-25-  
11 久光製薬株式会社筑波研  
究所内

[ADDRESS or DOMICILE]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

秋山 勝彦

Akiyama Katsuhiko

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

茨城県つくば市観音台1-25-  
11 久光製薬株式会社筑波研  
究所内

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

後藤 武

Goto Takeshi

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

茨城県つくば市観音台1-25-  
11 久光製薬株式会社筑波研  
究所内

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

佐藤 秀次

Sato Shuji

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

茨城県つくば市観音台1-25-  
11 久光製薬株式会社筑波研  
究所内

(74)【代理人】

(74)[AGENT]

【弁理士】

[PATENT ATTORNEY]

【氏名又は名称】

[NAME OR APPELLATION]

湯浅 恭三 (外5名)

Yuasa Kyoza (besides five persons)

**(57)【要約】****(57)[ABSTRACT of the Disclosure]****【課題】**

有用物質を動物細胞から大量に回収するための方法および細胞を提供する。

**[SUBJECT of the Invention]**

Method and cell for collecting useful matter from animal cell in large quantities are provided.

**【解決手段】**

有用物質を生産する動物細胞にアポトーシス抑制遺伝子を導入することにより目的とする有用物質の生産能を向上する方法および該導入により得られた細胞。

**[PROBLEM to be solved]**

Method of improving producing ability of target useful matter by introducing apoptosis inhibitor gene into animal cell which produces useful matter, and cell obtained by this introduction.

**【特許請求の範囲】****[CLAIMS]****【請求項1】**

有用物質を生産する動物細胞にアポトーシス抑制遺伝子を導入することにより目的とする有用物質の生産能を向上する方法。

**[CLAIM 1]**

Method to improve producing ability of target useful matter by introducing apoptosis inhibitor gene into animal cell which produces useful matter.

**【請求項2】**

アポトーシス抑制遺伝子が、bcl-2、BAG-1、Bcl-XL、Ad.E1bまたはCrmAであることを特徴とする請求項1記載の生産方法。

**[CLAIM 2]**

Apoptosis inhibitor gene is bcl-2, BAG-1, Bcl-XL, Ad.E1b, or CrmA.  
Production method of Claim 1 characterized by the above-mentioned.

**【請求項3】**

動物細胞が、bcl-2導入COS-1細胞であってFERM P-15808として寄託された細胞である請求項1記載の方法。

**[CLAIM 3]**

The method of Claim 1 that animal cell is bcl-2 introduction COS-1 cell, and is cell deposited as FERM P-15808.

**【請求項4】**

bcl-2導入COS-1細胞であ  
ってFERM P-15808として  
寄託された細胞。

**[CLAIM 4]**

Cell which is bcl-2 introduction COS-1 cell and  
was deposited as FERM P-15808.

**【発明の詳細な説明】****[DETAILED DESCRIPTION of the  
INVENTION]****【0001】****[0001]****【発明の属する技術分野】**

本発明は、新規な有用物質生産  
法および細胞に関する。さらに詳  
しくは、例えば、ハイブリドーマに  
よって生産される種々の抗体、遺  
伝子治療用ウィルスベクター、  
種々の組換え蛋白質例えば、イン  
ターフェロン等のサイトカイン類、  
ワクチン用の抗原物質等の有用  
物質の生産能向上法、ならびに  
該方法によって得られ、かつその  
目的のために使用される細胞の1  
種に関する。

**[TECHNICAL FIELD of the Invention]**

This invention relates to the new useful matter  
producing method and new cell.

In more detail, for example, various antibody  
produced by hybridoma, virus vector for gene  
therapies, and the various producing-ability  
improving method of recombinant protein for  
example, useful matter, such as antigenic  
substance cytokine, such as interferon, and for  
vaccine, and

One sort of cell which is obtained by this  
method and used for that objective, it is related  
with these.

**【0002】****[0002]****【従来技術】**

近年の遺伝子工学の急速な進歩  
により、様々な分子生物学的手法  
の開発が行われた。それによっ  
て、遺伝子情報の解析あるいは  
遺伝子の機能の解明においても  
著しい進歩が見られ、数々の有用  
物質についてさまざまな知見が得

**[PRIOR ART]**

Development of the various  
molecular-biological procedure is performed by  
rapid advance of genetic engineering in recent  
years.

Remarkable advance is looked at also in  
break-through of analysis of gene information,  
or function of gene by it, various findings about

られるようになってきた。これらの知見から得られた成果を実際の産業分野に応用しようとする試みの一つとして、動物細胞による有用物質の生産が数多くなされるようになってきた。例えば、抗体は、抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内において生産される蛋白質であり、免疫原と特異的に結合する活性を持ち、生体における防御機構の役割を担っている。このような免疫原に対する抗体の特異的結合活性を利用して、種々の分析薬、診断薬、あるいは治療薬が開発されている。これらの産業上用いられている抗体は、主に、目的抗体を生産するハイブリドーマを培養して生産されている。

**[0003]**

また、他の有用物質例えば、インターフェロン等のサイトカイン類、ワクチン、酵素、ペプチド性ホルモン、遺伝子治療用ウィルスベクター等も、種々の動物細胞により生産されている。

**[0004]**

以下に、動物細胞によって生産されている有用物質例を示す。

**[0005]**

(1) モノクローナル抗体  
一般に、モノクローナル抗体の製造法としては、まず、免疫原を哺

many useful matter have come to be acquired.

As one trial which is going to apply result obtained from these findings in actual industrial field, many production of useful matter by animal cell has come to be made.

For example, antibody is a protein produced in the living body by immunoreaction as a result of antigen irritation.

The specific avidity of antibody with respect to such immunogen which has activity specifically connected with immunogen and plays a role of barrier system in biological body is utilized, various analysis medicine, diagnostic, or therapeutic agent is developed.

Antibody used on such industries mainly cultivates hybridoma which produces objective antibody, and is produced.

**[0003]**

Moreover, virus vector for cytokine, such as other useful matter, for example, interferon etc., vaccine, enzyme, peptide hormone, and gene therapies etc. is produced by various animal cell.

**[0004]**

Below, example of useful matter currently produced by animal cell is shown.

**[0005]**

(1) Monoclonal antibody  
Generally, as a manufacturing method of monoclonal antibody, immunogen is immunized

乳動物に免疫し、B細胞を採取する。次に、これらのB細胞と骨髄腫細胞、具体的には、マウス由来では、X63-Ag8(X63)、NSI-Ag4/1(NS1)、P3X63-Ag8.654(X63\*654)、SP2/0-Ag14(SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7(45.6TG)、FO、S149/5XXO、BU.1、等；ラット由来では、210.RSY3.Ag1.2.3(Y3)、等；ヒト由来では、U-226AR(SKO-007)、GM1500\*GTG-A12(GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2(HMy2)、8226AR/NIP4-1(NIP41)等(ただし、括弧内は略号を示す)の細胞とを、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウイルス(HVJ)といった融合促進剤と共に混合して細胞融合させ、抗体産生能と増殖能を合わせ持つハイブリドーマを作製する。また、作製したハイブリドーマからの該抗体産生株の検索は、ELISA法(Method in Enzymology vol. 70. pp419-439)、凝集反応法、RIA法、二重免疫拡散法などにより行われる。クローニングは、限界希釈法により行われる。これらのハイブリドーマから抗体を得るには、ハイブリドーマを培地中にて培養し、培養上清から分離する方法、あるいは、ハイブリドーマを、マウス腹腔内に投与し、その腹水より回収する方法がある。

to mammal and B cells are collected first.

Next, these B cells and myelomatosis cell, specifically, by mouse origin, x63-Ag8(X63), NSI-Ag4/1(NS1), P3X63-Ag8.654(X63\*654), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), FO, S149/5XXO, BU.1, etc.;

By rat origin, 210.RSY3.Ag1.2.3(Y3), etc.;

By human origin, it is U-226AR(SKO-007), GM1500\*GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2), 8226AR/NIP4-1(NIP41) etc.

(However, inside of parenthesis shows symbol) Cell fusion of these cell are mixed and carried out with fusion promoters, such as polyethyleneglycol (PEG) and Sendai virus (HVJ).

Hybridoma having antibody-production ability and reproduction potency is produced.

Moreover, search of this antibody-production strain from produced hybridoma is performed by ELISA method (Method in Enzymology vol.70.pp 419-439), agglutination-reaction method, RIA method, double immunodiffusion, etc.

Cloning is performed by limiting dilution.

For obtaining antibody from these hybridoma, there are

Method to cultivate hybridoma in medium and separate from culture supernatant, or method of administering hybridoma to mouse intraperitoneal and collecting it from the abdominal dropsy.



**【0006】**

(2) ウィルスに対するワクチン  
ウィルスに対するワクチンを得るには、目的遺伝子を、適当な細胞株に導入し、目的組換え蛋白質を生産させている。具体例としては、培養サル腎細胞、ヒト二倍体細胞によるポリオ(死ウィルス、生ウィルス)に対するワクチン生産、Hela細胞、ヒト二倍体細胞によるアデノウィルスに対するワクチン生産、培養ニワトリ胚細胞による麻疹に対するワクチン生産、培養ニワトリ胚細胞によるおたふく風邪に対するワクチン生産、培養ニワトリ胚細胞、培養サル腎細胞、ヒト二倍体細胞、イヌ腎細胞、あるいはウサギ腎細胞による風疹に対するワクチン生産、ヒト二倍体細胞による狂犬病に対するワクチン生産、B型肝炎抗体陽性ヒト血漿によるB型肝炎に対するワクチン生産、培養サル腎細胞による口蹄疫に対するワクチン生産、培養サル腎細胞、ハムスター腎細胞によるニューキャッスル病に対するワクチン生産、培養サル腎細胞、ハムスター腎細胞によるジステンバーに対するワクチン生産等がある。

**【0007】**

(3) 免疫系に作用する因子(サイトカイン類)  
動物細胞を用いてサイトカイン類を生産する例としては、ヘルパーT細胞によるIL-2の生産、マウ

**【0006】**

(2) Vaccine with respect to virus  
In order to obtain vaccine with respect to virus, objective gene is introduced into suitable cell strain, and objective recombinant protein is produced.  
As example, vaccine production with respect to poliomyelitis (death virus, raw virus) by culture monkey renal cell and human diploid cell, vaccine production with respect to adenovirus by Hela cell and human diploid cell, vaccine production with respect to rubeola by culture chicken embryonic cell, vaccine production with respect to mumps by culture chicken embryonic cell, vaccine production with respect to German measles by culture chicken embryonic cell, culture monkey renal cell, human diploid cell, dog renal cell, or rabbit renal cell, vaccine production with respect to rabies by human diploid cell, vaccine production with respect to hepatitis B by hepatitis-B antibody-positive human plasma, vaccine production with respect to foot and mouth disease by culture monkey renal cell, vaccine production with respect to New Castle disease by culture monkey renal cell and hamster renal cell, vaccine production with respect to distemper by culture monkey renal cell and hamster renal cell  
There are these.

**【0007】**

(3) Factor which acts on immune system (cytokine)  
As example which produces cytokine using animal cell, production of IL-2 by helper T cell, production of M-CSF by mouse L cell,

スL細胞によるM-CSFの生産、CHU-2細胞によるG-CSFの生産、Mo細胞、エンドトキシンで誘導された胚や胎盤によるGM-CSFの生産、単核球、マクロファージによるIL-1の生産、Tリンパ球によるIL-3の生産、マウスT細胞ハイブリドーマによるIL-4の生産、Tリンパ球によるIL-5の生産、Tリンパ球によるIL-6の生産、腎によるエリスロポエチンの生産、ヒト骨髄性白血病細胞、マクロファージによるTNFの生産、ヒトB細胞株によるリンフォトキシンの生産、Bリンパ球、バーキットリンパ腫由来リンパ芽球細胞によるインターフェロン- $\alpha$ の生産、二倍体繊維芽細胞によるインターフェロン- $\beta$ の生産、T-リンパ球によるインターフェロン- $\gamma$ の生産等がある。

production of GM-CSF by production of G-CSF by CHU-2 cell, Mo cell, and embryo and placenta that were derived by endotoxin, production of IL-1 by mononuclear leukocyte and macrophage, production of IL-3 by T lymphocyte, production of IL-4 by mouse T-cell hybridoma, production of IL-5 by T lymphocyte, production of IL-6 by T lymphocyte, production of erythropoietin by kidney, production of TNF by human myelocytic-leukemia cell and macrophage, production of lymphotoxin by human B-cells strain, production of interferon-(alpha) by B lymphocyte and Burkitt's-lymphoma origin lymphoblast cell, production of interferon- (beta) by diploid fibrocyte, production of interferon- (gamma) by T lymphocyte, etc.

**【0008】**

**(4)細胞成長因子**

動物細胞による細胞成長因子の生産例としては、顎下腺、グリア細胞によるEGFの生産、内腫細胞、胎盤によるTGF- $\alpha$ の生産、血小板、血管内皮細胞によるPDGFの生産、顎下腺によるNGFの生産、血小板、腎、胎盤、多くの培養細胞によるTGF- $\beta$ の生産、平滑筋細胞、肝細胞によるIGF-Iの生産、胎児肝細胞、胎盤によるIGF-IIの生産、大脳、軟骨肉腫細胞によるFGFの生産等

**[0008]**

**(4) Cell growth factor**

As example of production of cell growth factor by animal cell, production of EGF by submandibular gland and glial cell, inner oma cell, production of TGF- (alpha) by placenta, production of PDGF by blood platelets and vascular endothelial cell, production of NGF by submandibular gland, production of TGF-(beta) by cultured cell of blood platelets, kidney, and placenta many, production of IGF-I by smooth muscle cell and hepatocytes, production of IGF-II by fetus hepatocytes and placenta, production of FGF by cerebrums and

が挙げられる。

enchondrosarcoma cell etc. is mentioned.

**【0009】****(5) 酵素**

動物細胞による酵素の生産例としては、正常ヒト二倍体繊維芽細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞や癌細胞による、ティシュープラスミノゲンアクティベータ(TPA)の生産、チャイニーズハムスター卵巣細胞によるレニンの生産等が挙げられる。

**[0009]****(5) Enzyme**

As an example of production of enzyme by animal cell, production of tissue plasminogen activator (TPA), production of renin by Chinese hamster ovarian cells, etc. by normal human diploid fibrocyte, Chinese hamster ovarian cells, or cancer cell are mentioned.

**【0010】****(6) ペプチド性ホルモン**

ペプチド性ホルモンを動物細胞から得るには、目的遺伝子を、適当な細胞株に導入し、目的とする組換えペプチド性ホルモンを生産させる。具体的には、Vero、C127細胞による成長ホルモンの生産などがある。

**[0010]****(6) Peptide hormone**

Objective gene is introduced into suitable cell strain in order to obtain peptide hormone from animal cell, recombinant peptide hormone made into objective is produced. Specifically, there is production of growth hormone by Vero and C127 cell etc.

**【0011】****(7) ウィルスベクター**

現在、ウィルスベクターは、パッケージング細胞株と呼ばれる組換えウィルス産生細胞によって生産されている。パッケージング細胞株は、組換えウィルスを生産するために必要な外来遺伝子が宿主細胞ゲノム配列に挿入された細胞株のことである。

**[0011]****(7) Virus vector**

Now, virus vector is produced by recombinant virus production cell called packaging cell strain. Foreign gene required in order that packaging cell strain may produce recombinant virus is thing of cell strain inserted in host-cell genome sequence.

**【0012】**

実際に、パッケージング細胞株が

**[0012]**

Moloney-leukemia-virus vector (A. D. Miller et

樹立されているウィルスベクターに、モロニー白血病ウィルスベクター (A.D. Miller et al., Sowat. Cell Mol. Genet., 12:175, 1986) 等がある。

al., Sowat.Cell Mol.Genet., 12:175, 1986) etc. is actually one of virus vectors by which packaging cell strain is established.

**[0013]**

しかしながら、以上に述べてきたこれら動物細胞による有用物質の生産は、

(1) 培養に、大量の培地を使うので、費用が多くかかる；

(2) 動物細胞は、原核生物による有用物質生産と比べると体積当たりの有用物質生産速度が低い；および

(3) 例えば、抗体を生産するハイブリドーマ等の有用物質産生細胞は、栄養が不足すると、急速にアポトーシスを起こして自殺してしまう (Biotechnology and Bioengineering, vol. 44, pp. 1140-1154, 1994) という欠点を有している。

**[0013]**

However, production of useful matter by these animal cells stated above, (1) Use a lot of media for culture.

Therefore, expense cuts in many.;

(2) Animal cell, compared with useful matter production by prokaryote, useful matter production rate per volume is low.; It reaches.

(3) For example, if useful matter production cell, such as hybridoma which produces antibody, runs short of nutritions, it has disadvantage of starting apoptosis quickly and committing suicide (vol. Biotechnology and Bioengineering, 44, pp.1140- 1154, 1994).

**[0014]**

それゆえ、有用物質産生能強化法すなわち、通常の培養を行っているときの有用物質産生能力以上に有用物質を生産させる方法の開発が、大きな課題となっている。

**[0014]**

So, development of method of producing useful matter beyond useful matter production capability when performing useful matter production ability strengthening, i.e., usual culture, is major subject.

**[0015]**

現在、有用物質を動物細胞から大量に回収するための方法とし

**[0015]**

Now, there is method of using the method of increasing culture amount once used for

て、一度の培養に用いる培養量を多くする方法、つまり、大量培養装置を用いる方法がある。動物細胞は、CHO、CV-1、COS、BHK、マウスL細胞、C127、Rat 2、NIH3T3、あるいはHela細胞などの接着依存性細胞と、ナマルバ細胞などの浮遊細胞とに大別できるが、それぞれについて、大量培養法として様々な方法が考案されている。すなわち、接着依存性細胞では、接着面積を拡大させるために、マルチプレート、ローファイバー、限外濾過膜、多孔質セラミックス、マイクロキャリアなどを用いる方法、浮遊細胞では、マイクロキャリア、スピナーフラスコ、攪拌培養槽、灌流培養槽、エアリフト培養槽などを用いた方法がある。しかし、いずれの培養法においても、目指すべき高密度培養の水準には達していない(ジャーファーマンテーターで、1kL-10kL相当細胞数にして、 $10^4-10^7$ 細胞/ml)。

**[0016]**

また、通常動物細胞の培養には、基礎培地に加えて、10%程度の血清を添加する必要がある。しかし、血清の添加は、生産コストに大きく影響すること、また、各血清のロットの間で細胞の増殖活性が異なり、これによって、安定した有用物質の生産ができないこと、血清中には、多くの未知物質が含ま

culture, stuffing, and mass-culture apparatus as method for collecting useful matter from animal cell in large quantities.

Animal cells are CHO, CV-1, COS and BHK, mouse L cell, C127 and Rat2, and NIH3T3, or it can divide roughly into attachment dependent cell, such as Hela cell, and float cell, such as namalwa cell.

However, various method as a mass-culture method is devised about each.

That is, method of using multi plate and enamel fiber, ultrafiltration membrane, porous ceramics, micro carrier, etc. in attachment dependent cell, in order to enlarge adhesive area, in float cell, there is method which used micro carrier, spinner flask, spinner-culture tank, perfusion-culture tank, air-lift culture tank, etc.

However, in which culture method, level of high density cultivation which should be aimed at is not reached (with jar fermenter, it is made the number of cell by 1kL-10kL, and they are  $10^4-10^7$  cell / ml).

**[0016]**

Moreover, in addition to basal medium, it is necessary to usually add about 10% of blood serum for culture of animal cell.

However, the propagation activities of cell differ by Hazama of that addition of blood serum influences production cost greatly, and lot of each blood serum, many unknown matter is contained in that production of stable useful matter cannot be performed by this, and blood

れており、生産物の精製を困難と  
しているなどの問題点がある。こ  
のような理由から、工業的規模の  
生産では、血清の添加を必要とし  
ない無血清培地が用いられてい  
るが、血清を含む培地で培養した  
場合と比べると有用物質の生産  
効率が低いという問題点が依然と  
して残っている。

**[0017]**

これら有用物質の生産効率を向  
上させるためにいくつかの方法が  
考案されている。具体的には、抗  
体生産ハイブリドーマをマウス腹  
腔内に移植する際に、マイトジェ  
ン及び、フロイント完全アジュバン  
ト等を腹腔内に投与し、腹水量を  
多くして得られる抗体の絶対量を  
増大させる方法(特開平02-53  
736号公報)、単離した動物細胞  
を、3次元集合体として多孔性  
基材上で血清不含培養液を用い  
て培養することにより、動物細胞を  
高密度で長期にわたりその生産  
物を安定して生産させ、生産物の  
調製を効率よく行うことができるよ  
うにする方法(特開平03-1609  
88号公報)、卵黄リボ蛋白質、ロ  
ーヤルゼリー、ラクトフェリンといっ  
たリンパ球増殖因子を培地に添  
加する方法(特開平02-25789  
2号公報)等がある。

**[0018]**

serum, there are problems, such as making  
purification of product difficult.

Since it is such, in production of industrial scale,  
serum free medium which does not need  
addition of blood serum is used.

However, compared with case where it  
cultivates by medium containing blood serum,  
problem that productive efficiency of useful  
matter is low is still in remaining.

**[0017]**

Some method is devised in order to improve  
productive efficiency of these useful matter.

Method to increase absolute quantity of  
antibody obtained by administering mitogen,  
Freund's complete adjuvant, etc. to  
intraperitoneal, and making much  
abdominal-dropsy amount specifically when  
transplanting antibody production hybridoma to  
mouse intraperitoneal

(Unexamined-Japanese-Patent No. 02-53736),  
method to produce the product for animal cell  
with stability over long period by high density,  
and to enable it to perform manufacture of  
product efficiently by culturing animal cell which  
isolated on porous base material, using blood  
serum non-containing culture medium as a  
3-dimensional aggregate

(Unexamined-Japanese-Patent No.  
03-160988), there is the method  
(Unexamined-Japanese-Patent No. 02-257892)  
of adding lymphoid-corpucle proliferation  
factors, such as yolk lipoprotein, royal jelly, and  
lactoferrin, to medium etc.

**[0018]**

しかしながら、いずれの方法においても、細胞増殖に伴う貧栄養化およびそれに伴う細胞のアポトーシスを避けることはできず、有用物質の生産量には限界がある。

【0019】

**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的は、抗体、インターフェロン等のサイトカイン類、ワクチン用の抗原物質、遺伝子治療用ウィルスベクター等の有用物質を動物細胞から生産する際に、長期にわたって動物細胞の生存を可能とし、それによって有用物質の単位培養量当たりの生産効率を向上させることにある。

【0020】

**【課題を解決するための手段】**

上記目的を達成するため、鋭意研究した結果、本発明者らは、有用物質を生産する動物細胞のアポトーシスを抑制することにより、抗体、インターフェロン等のサイトカイン類、ワクチン用の抗原物質、遺伝子治療用ウィルスベクター等の有用物質を生産する動物細胞の死滅を抑制し、これによって単位培養量当たりの動物細胞による有用物質産生能を顕著に向上させることができることを発見して本発明を完成した。

【0021】

However, also in any method, apoptosis of cell accompanying oligotrophication-izing accompanying cell growth and it cannot be avoided, but there is limit in throughput of useful matter.

【0019】

**【PROBLEM to be solved by the Invention】**

When objective of the invention produces useful matter, such as cytokine, such as antibody and interferon, antigenic substance for vaccine, and virus vector for gene therapies, from animal cell, it enables survival of animal cell over long period of time, and there is in improving productive efficiency per unit culture amount of useful matter by it.

【0020】

**【MEANS to solve the Problem】**

Earnest research was done in order to attain the above-mentioned objective.

As a result, present inventors inhibits extinction of animal cell which produces useful matter, such as cytokine, such as antibody and interferon, antigenic substance for vaccine, and virus vector for gene therapies, by inhibiting apoptosis of animal cell which produces useful matter, by this, it discovered that useful matter production ability by animal cell per unit culture amount could be improved notably, and this invention was perfected.

【0021】

すなわち、本発明は、有用物質を生産する動物細胞にアポトーシス抑制遺伝子を導入することにより目的とする有用物質の生産能を向上する方法、ならびに該方法により得られ、該方法の目的のため使用される細胞の1つである、BCMGSneo-bcl-2導入COS-1細胞を提供する。本発明の方法あるいは細胞を使用すれば、有用物質産生細胞の生存率を向上させることができるのみならず、単位培養量当たりの有用物質生産量の増加および有用物質生産速度の向上を得ることができる。

[0022]

**【発明の実施の形態】**

本発明の方法を用いて生産能を向上させることのできる有用物質には、抗体、インターフェロン等のサイトカイン類、ワクチン、酵素、ペプチド性ホルモン、遺伝子治療用ウィルスベクター等の動物細胞によって産生されるものであればその種類を問わない。

[0023]

本明細書でアポトーシス抑制遺伝子とは、例えば、細胞増殖因子の除去、ホルモンの除去、細胞障害性リンパ球等による受容体刺激、抗癌剤、放射線照射、毒素、ウィルス感染、亜鉛イオンの不足、熱ショック、TNF- $\alpha$ 、 $\beta$ 等

That is, this invention provides method of improving producing ability of target useful matter by introducing apoptosis inhibitor gene into animal cell which produces useful matter, and BCMGSneo-bcl-2 introduction COS-1 cell which is one of the cell which is obtained by this method and used for objective of this method.

If method or cell of this invention is used, it not only can improve viability rate of useful matter production cell, but it can obtain increase in useful matter throughput per unit culture amount, and improvement of useful matter production rate.

[0022]

**【EMBODIMENT of the Invention】**

To useful matter which can be made to improve producing ability using the method of this invention, if animal cells, such as virus vector for cytokine, such as antibody and interferon, vaccine, enzyme, peptide hormone, and gene therapies, produce, it is of little concern in the kind.

[0023]

On these specifications, apoptosis inhibitor gene inhibits apoptosis derived by various factors, such as tumor necrosis factors, such as lack of receptor irritation by elimination of cell growth factor, elimination of hormone, cytotoxic lymphocyte, etc., carinostatic, radiation exposure, toxin, virus infection, and zinc ion,



の腫瘍壊死因子、抗Fas抗体、などの様々な因子により誘導されるアポトーシスを抑制し、細胞を延命化させる機能を有している蛋白質をコードする遺伝子を意味する。本発明で利用できるアポトーシス抑制遺伝子には、例えばbcl-2、BAG-1、Bcl-XL、Ad.E1b、CrmAなどが含まれる。その一例であるbcl-2は、生体内において広範な組織、特に免疫系や神経系で顕著に発現し、また長期間生存幹細胞の存在する皮膚や小腸などの上皮細胞においても発現が観測されており (Negrini, M. et al., Cell, 49:455-463, 1987; Eguchi, Y. et al., Nuc. Acid Res., 20:4187-4192, 1992; Hockenbery, D.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:6961-6965, 1991)、生体内の多くの局面で細胞の自殺防止ならびに延命化に関与すると考えられている (Vaux, D.L. et al., Nature, 335:440-442, 1988)。bcl-2遺伝子はヒト非ホジキン型リンパ腫の染色体転座t(14;18)よりクローニングされた (Science vol. 226. pp1097(1984)) 26kD蛋白質のbcl-2 $\alpha$ 、22kD蛋白質のbcl-2 $\beta$ をコードする遺伝子であることが知られている。

heat shock, TNF- (alpha), and (beta), and anti-Fas antibody, and means gene which codes protein which has function made to prolong life cell.

Bcl-2, BAG-1, Bcl-XL, Ad.E1b, and CrmA etc. are contained in apoptosis inhibitor gene which can be used by this invention.

Bcl-2 which are the example are notably expressed by in the living body extensive tissue especially immune system, or nervous system, moreover, also in epitheliocyte in which prolonged survival stem cell exists, such as skin and small intestine, it observes expression.

(Negrini, M. et al., Cell, 49:455-463, 1987; Eguchi, Y. et al., Nuc. Acid Res., 20:4187-4192, 1992; Hockenbery, D.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:6961-6965, 1991), it is thought that it is involved in suicide prevention and life prolongation of cell on many situation in the living body (Vaux, D.L. et al., Nature, 335:440-442, 1988).

It is known that bcl2 gene is gene which codes bcl-2 (beta) of bcl-2 (alpha) of 26 (Science vol. 226. pp1097 (1984)) kD protein which it cloned from chromosomal translocation t of human non-Hodgkin's type lymphoma (14; 18), and 22kD protein.

**[0024]**

本発明の有用物質産生能強化法

**[0024]**

Useful matter production ability strengthening of

は、以下の方法によりアポトーシス抑制遺伝子を有用物質産生細胞に導入することによって行われるが、この方法に限定されるものではない。すなわち、有用物質を生産する有用物質産生細胞に対して、例えば、薬物耐性遺伝子配列を含む発現ベクタープラスミドに組み込んだbcl-2を導入する。細胞への遺伝子導入法は既に公知のエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポソーム法等の物理的導入法に加え、マウス白血病ウィルスベクターなどのウィルスベクターによる生物的導入法などが使用される。導入後、該薬物耐性遺伝子に対応する薬剤によって薬剤選択を行い、bcl-2が導入された細胞のみを選択する。また、クローニング法については、例えば、メチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法などの、既知の方法を、特に制限無く用いることができる。薬剤選択によって得られた細胞株は、アポトーシス抑制遺伝子が導入されなかった細胞株に比して、特に長期の培養において有用物質産生能が優れている。

**[0025]**

抗体の生産に関していえば、ハイブリドーマは、培養期間が長くなって培地中の栄養分が不足すると同時に生存率が低下することが

this invention is performed by introducing apoptosis inhibitor gene into useful matter production cell with following method.

However, it is not limited to this method.

That is, as opposed to useful matter production cell which produces useful matter, bcl-2 integrated in expression vector plasmid including drug tolerance gene sequence are introduced.

In addition to the physical introducing methods, such as the electroporation method gene-transfer method to cell is already well-known, calcium-phosphate method, and the liposome method, the biotic introducing method by virus vectors, such as murine-leukemia-virus vector, etc. is used.

Chemicals corresponding to this drug tolerance gene perform chemicals choice after introduction, and only cell into which bcl-2 were introduced is chosen.

Moreover, about cloning process, known method, such as the methylcellulose method, the soft agarose method, and limiting dilution, can be used in particular without limit, for example.

Cell strain obtained by chemicals choice is compared with cell strain into which apoptosis inhibitor gene was not introduced, in long-term culture, useful matter production ability is excellent in particular.

**[0025]**

Concerning production of antibody, while culture period gets long hybridoma and it runs short of nutrient in medium, it is known that viability rate will fall.

知られているが、アポトーシス抑制遺伝子例えば、bcl-2を導入することにより、細胞を延命化させることができ、抗体の生産量および生産速度を著しく増大させることができる。

**[0026]**

また、本発明は、遺伝子治療に用いられる組換えウィルスベクター生産にも応用することができる。一般的に、組換えウィルスベクターは、パッケージング細胞といわれる組換えウィルスベクター産生細胞により生産される。パッケージング細胞は、長期の培養を行うと、貧栄養化により、細胞が死ぬことが知られている。しかし、このパッケージング細胞に、アポトーシス抑制遺伝子を導入すると、パッケージング細胞の延命化が図れ、力価を向上させることができる。このような、貧栄養化による細胞死は、上述したような他の有用組換え蛋白質産生細胞においても生ずるが、アポトーシス抑制遺伝子を導入することにより、組換えウィルスベクターを生産するパッケージング細胞と同様に、細胞の延命化を行うことができ、生産量を増大させることができる。

**[0027]**

本発明のBCMGSneo-bcl-2導入COS-1細胞(以下、COS1/bcl2)は、細胞を延命化させる

However, cell can be prolonged life by introducing apoptosis inhibitor gene (for example, bcl-2), throughput and production rate of antibody can be increased remarkably.

**[0026]**

Moreover, this invention can be applied also to recombinant virus vector production used for gene therapy.

Recombinant virus vector is generally produced by recombinant virus vector production cell called packaging cell.

If packaging cell performs long-term culture, it is known by oligotrophication-ization that cell will die.

However, if apoptosis inhibitor gene is introduced into this packaging cell, life prolongation of packaging cell can be attained, titer can be improved.

Cell death by such oligotrophication-izing is generated also in above-mentioned other useful recombinant protein production cell.

However, by introducing apoptosis inhibitor gene, like packaging cell which produces recombinant virus vector, life prolongation of cell can be performed and throughput can be increased.

**[0027]**

BCMGSneo-bcl-2 introduction COS-1 cell (following, COS1/bcl2) of this invention was found out by this invention by prolonging life cell

ことによって蛋白質の生産量および生産速度を著しく増大させることができる動物細胞として本発明により見出し出したものであり、上述の(1)～(7)の有用物質の大量生産に応用できるものである。蛋白質の代替物質として、検出感度のよい鎖蛋白質を使用し、COS1/bcl2の効果が確認できる。

as an animal cell which can increase proteinic throughput and proteinic production rate remarkably.

It can apply to mass production of useful matter of above-mentioned (1)-(7).

As a proteinic substitute substance, (lambda) strand protein with sufficient detection sensitivity is used, effect of COS1/bcl2 can be checked.

**[0028]**

COS1/bcl2は平成8年8月26日に工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-15808として寄託された。

**[0028]**

COS1/bcl2 are deposited with National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology as FERM P-15808 on August 26, Heisei 8.

**[0029]****【実施例】**

以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

**[0029]****[EXAMPLES]**

Example is shown to below and this invention is specifically demonstrated to it.

However, this invention is not limited to these Examples.

**[0030]****実施例1: プラスミドの構築**

本実施例では、以下のプラスミドを用いた。

**[0030]****Example 1: Assembly of plasmid**

The following plasmids were used in this Example.

**[0031]**

ヒトbcl-2遺伝子配列を含むプラスミドBCMGSneo-bcl-2(図1)は、発現ベクターBCMGSneo (Karasuyama, H., Kudo, A., Melchers, J. Exp. Med., 172:969-972, 1990)

**[0031]**

Plasmid BCMGSneo-bcl-2 (FIG. 1) including human bcl2 gene sequence was built by inserting this bcl2 gene in Xho I-Not I part of expression vector BCMGSneo (Karasuyama, H., Kudo, A., Melchers, J. Exp. Med., 172:969-972, 1990).

のXho I-Not I部位に該bcl-2遺伝子を挿入することにより構築した。なお、bcl-2遺伝子としてはbcl-2 $\alpha$ を用いた。

In addition, bcl-2 (alpha) was used as a bcl2 gene.

**[0032]**

また、比較例として、bcl-2遺伝子を含まないプラスミドとして、BCMGSneo(図2)を以降の試験に用いた。

**[0032]**

Moreover, BCMGSneo (FIG. 2) was used for subsequent examinations as Comparative Example as a plasmid which does not contain bcl2 gene.

**[0033]**

実施例2:ヒトbcl-2遺伝子のハイブリドーマ細胞への導入  
 トリニトロフェニル基をハプテンとして認識する抗体を産生するマウスハイブリドーマ2E3株に対し、実施例1で調製したBCMGSneo-bcl-2または、比較例としてBCMGSneoをエレクトロポレーション法により導入した(バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現解析法 p23-27)。導入後、G418(GIBCO)選択圧をかけ、プラスミドの導入された細胞のみを選択した。

**[0033]**

Example 2: Introduction to hybridoma cell of human bcl2 gene  
 BCMGSneo was introduced by the electroporation method to two E3 strain of mouse hybridoma which produces antibody which recognizes trinitro phenyl group as a hapten as BCMGSneo-bcl-2 prepared in Example 1, or Comparative Example 1, or Comparative Example 4 gene transfer and expression analysis method p23-27).  
 G418 (GIBCO) selection pressure was applied after introduction, and only cell into which plasmid was introduced was chosen.

**[0034]**

実施例3:ヒトbcl-2遺伝子導入ハイブリドーマ細胞におけるBcl-2蛋白質産生の検出(ウエスタンブロッティングによる解析)  
 実施例2において樹立されたBCMGSneo-bcl-2導入ハイブリドーマ細胞のBcl-2蛋白質産生の検出を行った。陰性対照とし

**[0034]**

Example 3: Detection of Bcl-2 protein production in human bcl2 gene introduction hybridoma cell (analysis by Western blotting)  
 Detection of Bcl-2 protein production of BCMGSneo-bcl-2 introduction hybridoma cell established in Example 2 was performed.  
 As a negative control, similar examination was performed also about BCMGSneo introduction

て、BCMGSneo導入ハイブリドーマ細胞に関しても同様の検討を行った。

(1)細胞の溶解液の調製

BCMGSneo-bcl-2導入ハイブリドーマ細胞、および、BCMGSneo導入ハイブリドーマ細胞懸濁液を1%トライトンX-100、0.15mM NaCl、10mM Tris (pH7.4)、50  $\mu$ g/mL phenyl methanesulfonyl fluoride、及び、2  $\mu$ g/mL aprotininを含む細胞溶解液を用いて、4℃で30分間反応させ、細胞を溶解させた。本細胞溶解液をウエスタンブロッティングの試料として用いた。

**[0035]**

(2)ウエスタンブロッティングによる解析

ウエスタンブロッティングによる解析は、公知の方法に従って行った(バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現解析法 p123-127)。1 $\times$ 10<sup>5</sup>個の細胞に相当する細胞溶解液をTris-SDS-mercaptoethanol緩衝液とを混合して5分間煮沸したのち、sodium dodecyl sulfate(SDS)-ポリアクリルアミドゲル(bcl-2を検出する際のポリアクリルアミドゲルの濃度は、13%とするのが最も好ましい)に試料を負荷した。電気泳動終了後、ゲルを取り外し、30分以上Tris-glycine緩衝液

hybridoma cell.

(1) Manufacture of solution of cell

BCMGSneo-bcl-2 introduction hybridoma cell and BCMGSneo introduction hybridoma cell suspension are made to react for 30 minutes at 4 degrees C using cell solution containing 1% Triton X-100, 0.15 mM NaCl, 10 mM Tris (pH7.4), 50 microgram/mL phenyl methanesulfonyl fluoride, and 2 microgram/mL aprotinin.

Cell was dissolved.

This cell solution was used as a sample of Western blotting.

**[0035]**

(2) Analysis by Western blotting

Analysis by Western blotting was conducted according to well-known method (bio-manual series 4 gene transfer and expression analysis method p123-127).

After mixing Tris-SDS-mercaptoethanol buffer and carrying out Hazama boiling of the cell solution which corresponds to 1 $\times$ 10<sup>5</sup> piece cell for 5 minutes, load of the sample was carried out to sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel (as for concentration of polyacrylamide gel at the time of detecting bcl-2, it is most desirable to consider it as 13%).

Gel is removed after the electrophoresis completion, it dipped in Tris-glycine buffer 30 minutes or more.

に浸した。ゲルにニトロセルロースフィルターを装着し、蛋白質をニトロセルロースフィルターに転写後、ニトロセルロースフィルターを取り出し、Tris buffered saline-0.05% Tween20 (TBS-T) に15分浸し、5%のスキムミルクを含むTBS-T中に2時間浸した後、TBS-Tによる洗浄を3回行った。

Gel is equipped with nitrocellulose filter, nitrocellulose filter is taken out after transferring protein in nitrocellulose filter, tris buffered saline-0.05% Tween20 (TBS-T) for 15 minutes, after dipping into TBS-T containing 5% of skim milk for 2 hours, washing by TBS-T was performed 3 times.

**[0036]**

このようにして調製したニトロセルロースフィルターを用い、Bcl-2抗体 (Boehringer Manneheim) を含むTBS-T溶液にニトロセルロースフィルターを浸して、1時間穏やかに振とうし、TBS-T溶液で3回洗浄後、二次抗体のパーオキシダーゼ結合抗マウスIgGポリクローナル抗体 (Bio Source International, Inc-Tago Products) を含むTBS-T溶液にニトロセルロースフィルターを浸した。1時間穏やかに振とうし、TBS-T溶液で3回洗浄後EC1検出試薬 (アマシャム) にニトロセルロースフィルターを浸した後、フィルムに感光させた。

**[0036]**

Thus, prepared nitrocellulose filter is used, nitrocellulose filter is dipped in TBS-T solution containing Bcl-2 antibody (Boehringer Manneheim), it shook-quietly for 1 hour and nitrocellulose filter was dipped in TBS-T solution which contains peroxidase joint anti- mouse Ig polyclonal antibody (Bio Source International, Inc-Tago Products) of secondary antibody after 3 times washing with TBS-T solution.

Film was exposed, after shaking quietly for 1 hour and dipping nitrocellulose filter in EC1 detection reagent after 3 times washing (Amersham) with TBS-T solution.

**[0037]**

結果を図3に示す。BCMGSneo-bcl-2を導入した細胞 (図3中では実施例3として示す) では、Bcl-2蛋白質の発現を示すバンドが検出されたが、陰性対照群のB

**[0037]**

Result is shown in FIG. 3.

In cell (in FIG. 3, it shows as Example 3) which introduced BCMGSneo-bcl-2, it detected band which shows expression of Bcl-2 protein.

However, band which shows expression of

CMGSneoを導入した細胞(図3中では比較例3として示す)からは、Bcl-2蛋白質の発現を示すバンドは検出されなかった。

Bcl-2 protein from cell (it shows as Comparative Example 3 in FIG. 3) which introduced BCMGSneo of negative-control group was undetectable.

**[0038]**

実施例4: ヒトbcl-2遺伝子導入によるハイブリドーマ細胞の生存率の向上  
実施例2において樹立されたBCMGSneo-bcl-2導入ハイブリドーマ細胞および、陰性対照群であるBCMGSneo導入ハイブリドーマ細胞の生存率を比較した。

**[0038]**

Example 4: Improvement of viability rate of hybridoma cell by human bcl2 gene introduction  
Viability rate of BCMGSneo-bcl-2 introduction hybridoma cell established in Example 2 and BCMGSneo introduction hybridoma cell which is negative-control group was compared.

**[0039]**

各々の細胞を9%牛胎児血清を含むダルベッコ・モディファイド・イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(以下、DMEM培地)(GIBCO社)中に懸濁し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に放置した。培養開始から2日毎に細胞を回収し、トリパンブルー染色法により各ハイブリドーマの生存率を算出した。

**[0039]**

Each cell is suspended in Dulbecco \* modified \* eagle medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO) (henceforth, DMEM medium) which contains foetal bovine serum 9%, it was left in CO<sub>2</sub> incubator.  
Cell is collected from culture start every two days, viability rate of each hybridoma was computed with trypan-blue staining.

**[0040]**

結果を図4に示す。陰性対照群(図4中では比較例4として示す)では、培養6日目において約50%の生存率を示したのに対して、bcl-2導入細胞群(図4中では実施例4として示す)では10日目であった。この細胞生存率の延長は細胞に導入されたbcl-2遺

**[0040]**

Result is shown in FIG. 4.  
By bcl-2 introduction cell group (in FIG. 4, it shows as Example 4), it was the 10th day to having shown about 50% of viability rate in the 6th day of culture by negative-control group (it showing as Comparative Example 4 in FIG. 4).  
It is thought that extension of this cell survival rate is based on effect of bcl2 gene introduced



伝子の効果によるものと考えられる。  
into cell.

**[0041]**

実施例5:ヒトbcl-2遺伝子導入による抗体生産効率の向上  
実施例2において樹立されたBCMGSneo-bcl-2導入ハイブリドーマ細胞および、陰性対照群であるBCMGSneo導入ハイブリドーマ細胞の抗体産生能を比較した。

**[0041]**

Example 5: Improvement of antibody productive efficiency by human bcl2 gene introduction  
Antibody-production ability of BCMGSneo-bcl-2 introduction hybridoma cell established in Example 2 and BCMGSneo introduction hybridoma cell which is negative-control group was compared.

**[0042]**

各々の細胞を9%牛胎児血清を含むDME培地中に懸濁し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内に放置した。培養開始から2日毎に培養上清を回収し、本上清に含まれる抗体の濃度をELISA法により測定した。ELISAは抗マウスIgGポリクローナル抗体(ZYMED Laboratories)、及びパーオキシダーゼ結合抗マウスIgGポリクローナル抗体(Bio Source International, Inc-Tago Products)を用いたサンドイッチ法で行った。

**[0042]**

Each cell is suspended in DME medium which contains foetal bovine serum 9%, it was left in CO<sub>2</sub> incubator.  
Culture supernatants are collected from culture start every two days, concentration of antibody contained in this supernatant liquid was measured with ELISA method.  
ELISA was performed by the sandwiching method which used anti- mouse IgG polyclonal antibody (ZYMED Laboratories) and peroxidase joint anti- mouse Ig polyclonal antibody (Bio Source International, Inc-Tago Products).

**[0043]**

結果を図5に示す。陰性対照群(図5中では比較例5として示す)に比べて、bcl-2導入細胞群(図5中では実施例5として示す)においては、培養時間の増加とともに、著しく抗体濃度が上昇し、10日目では4倍以上の差が見られ

**[0043]**

Result is shown in FIG. 5.  
Compared with negative-control group (in FIG. 5, it shows as Comparative Example 5), antibody concentration rises remarkably with increase in culture time in bcl-2 introduction cell group (in FIG. 5, it shows as Example 5), difference of 4 times or more is seen in the 10th

た。

day.

**[0044]**

実施例6:ヒトbcl-2遺伝子導入による抗体生産速度の向上  
 また、実施例5で抗体生産効率を測定された各ハイブリドーマ細胞の抗体産生速度についても比較検討した。図6に示すように、bcl-2導入細胞群(図6中では実施例6として示す)の抗体産生速度は、どの期間においても陰性対照群(図6中では比較例6として示す)の2倍以上であった。

**[0044]**

Example 6: Improvement of antibody production rate by human bcl2 gene introduction

Moreover, comparison examination was carried out also about antibody-production speed of each hybridoma cell which had antibody productive efficiency measured in Example 5. As shown in FIG. 6, antibody-production speed of bcl-2 introduction cell group (in FIG. 6, it shows as Example 6) was more than double of negative-control group (in FIG. 6, it shows as Comparative Example 6) in every period.

**[0045]**

実施例7:プラスミドの構築  
 本実施例では、以下のプラスミドを用いた。全ての操作は、公知の方法(J. Sambrook, et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)により行なった。

**[0045]**

Example 7: Assembly of plasmid  
 The following plasmids were used in this Example.  
 All operations were performed by well-known method (J. Sambrook, et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

**[0046]**

ヒトbcl-2遺伝子配列を含むプラスミドBCMGSneo-bcl-2(図1)は、発現ベクターBCMGSneo(Karasuyama, H., Kudo, A., Melchers, J. Exd., Med., 172:969-972, 1990)のXhoI-NotI 部位に該bcl-2遺伝子を挿入することにより構築した。

**[0046]**

Plasmid BCMGSneo-bc 1-2 (FIG. 1) including one to human bc2 gene sequence was built by inserting this bcl2 gene in XhoI-NotI part of expression-vector BCMGSneo (Karasuyama, H., Kudo, A., Melchers, J.Exd., Med., 172:969-972, 1990).

**[0047]**

また、比較例として、bcl-2遺伝子を含まないプラスミド、BCMGSneo(図2)を以降の試験に用いた。

**[0047]**

Moreover, plasmid and BCMGSneo (FIG. 2) which do not contain bcl2 gene were used for subsequent examinations as Comparative Example.

**[0048]**

マウス免疫グロブリン1gMのL鎖を構成する蛋白質λ鎖をコードする遺伝子配列(以下、マウスλ1)を含むプラスミドpcDNA-λ(図7)は、pCMV-λ1(Toyoshima, H. et al., Ce11, 8, 67-74, 1994)よりPCR法にてマウスλ1鎖部分を増幅してcDNAを合成し、プラスミドベクターpcDNA3(In vitrogen社)に挿入することにより構築した。

**[0048]**

From pCMV-(lambda)I (Toyoshima, H. et al., Ce11, 8, 67-74 and 1994), plasmid pcDNA-(lambda) (FIG. 7) including gene sequence (following and mouse (lambda)I) which codes protein (lambda) strand which comprises L chain of mouse immunity globulin 1gM amplifies a part for mouse (lambda)1 chain part by PCR method, and compounds cDNA, it built by inserting in plasmid vector pcDNA3 (In vitrogen).

**[0049]**

実施例8: ヒトbcl-2遺伝子のCOS-1細胞への導入  
BCMGSneo-bcl-2、あるいはBCMGSneoを電気穿孔法(J. Sambrook, et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)によりCOS-1細胞に導入した。

**[0049]**

Example 8: Introduction to COS-1 cell of human bcl2 gene  
BCMGSneo-bcl-2 or BCMGSneo was introduced into COS-1 cell by electroporation method (J. Sambrook, et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

**[0050]**

COS-1細胞を $10^7$ 個用意し、リン酸緩衝液(PBS)450μlに懸濁した。プラスミドDNA10μgを50μlのPBSに溶解し、前記の細胞懸濁液と混合してキュベットに入

**[0050]**

$10^7$  piece of COS-1 cell is prepared, it suspended in phosphate buffer (PBS) 450 microliter.  
Plasmid DNA10 microgram is dissolved in PBS of 50 microliter, it mixed with the

れた。パルス装置を650V、250  $\mu$ secに設定し、細胞懸濁液の入ったキュベットに20回パルスをかけた。氷上にて10分間放置した後、400  $\mu$ g/mlのG418 (GIBCO社) 及び10%の胎仔牛血清 (Fetal Bovine Serum) (FBS) (GIBCO社) を含むダルベッコ・モディファイド・イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (以下、DMEM培地) (GIBCO社) と混合し、CO<sub>2</sub> インキュベータ内に30日間放置することで遺伝子導入がなされた細胞のみを選択して、BCMGSneo-bcl-2導入COS-1細胞 (以下、COS1/bcl2) 及びBCMGSneo導入COS-1細胞 (以下、COS1/vec) を得た。BCMGSneo-bcl-2導入COS-1細胞 (以下、COS1/bcl2) は平成8年8月26日に工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-15808として寄託された。

#### 【0051】

##### 試験例7: bcl-2導入細胞のアポトーシスに対する抵抗性の評価

細胞を低血清濃度の培地中で培養すると、これが引き金となってアポトーシスが誘導され、細胞死が起こることが知られている。そこでbcl-2を導入した細胞のアポトーシスに対する抵抗性を調べるために以下の検討を行なった。

above-mentioned cell suspension, and put into cuvette.

Pulse apparatus is set as 650V and 250 microsecond, pulse was applied to cuvette containing cell suspension 20 times.

It mixes with Dulbecco's modified eagle medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO) (henceforth, DMEM medium) containing 400 microgram/ml G418 (GIBCO) and 10% of foetus bovine serum (Fetal Bovine Serum) (FBS) (GIBCO), after leaving it for 10 minutes in on ice, only cell from which gene transfer was made by leaving it for 30 days in CO<sub>2</sub> incubator is chosen, bCMGSneo-bcl-2 introduction COS-1 cell (following, COS1/bcl2) and BCMGSneo introduction COS-1 cell (following, COS1/vec) were obtained.

BCMGSneo-bcl-2 introduction COS-1 cell (following, COS1/bcl2) is deposited with National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology as FERM P-15808 on August 26, Heisei 8.

#### 【0051】

##### Experiment 7: Evaluation of resistance with respect to apoptosis of bcl-2 introduction cell

If cell is cultured in medium of low blood serum concentration, this will constitute trigger and apoptosis will be derived, it is known that cell death will happen.

Then, the following examination was performed in order to examine resistance with respect to apoptosis of cell which introduced bcl-2.

**【0052】**

(ヒトbcl-2遺伝子を導入したCOS-1細胞の低血清濃度培地中での培養と生細胞数の測定) COS1/bcl2(実施例8)及びCOS1/vec(比較例7)を各々 $10^5$ 個ずつ0.2%のFBSを含むDMEM培地中で一定期間培養した。培養開始後、2日目、及び9日目に培養皿をPBSで洗浄し、トリプシンで処理することにより培養皿から剥がし、細胞懸濁液を調製した。トリパンブルーにより細胞を染色後、顕微鏡により観察して生細胞数を数えた。結果を図8に示す。比較例7に示されたbcl-2遺伝子を導入されていない細胞は、培養開始時の細胞数( $10^5$ 個)上りも減少しているのに対して、実施例8に示されるbcl-2遺伝子が導入された細胞は9日目には初期の細胞数の4倍以上にまで増殖した。本結果から、実施例8で樹立されたCOS1/bcl2細胞が、強いアポトーシス抵抗性を示すことが明らかである。

**【0053】**

試験例8 bcl-2遺伝子導入による蛋白生産性の向上  
 アフリカミドリザル由来のCOS-1細胞は、組み換え蛋白質の発現、生産に広範に用いられている。そこで、アポトーシス抑制遺伝子を導入した際の、蛋白生産性について評価した。

**【0052】**

(Measurement of culture in low blood serum concentration medium of COS-1 cell, and living cell number which introduced human bcl2 gene) COS1/bcl2 (Example 8) and COS1/vec (Comparative Example 7), each  $10^5$  piece, fixed period culture was carried out in every and DMEM medium containing 0.2% of FBS.

Culture dish will be washed by PBS after culture start on second day and the 9th, it peels from culture dish by treating with trypsin, cell suspension was prepared.

By trypan blue, after coloring cell, it observed under microscope and living cell number was counted.

Result is shown in FIG. 8.

Cell into which bcl2 gene shown by Example 8 was introduced was propagated to 4 or more times of the number of cell of initial stage on the 9th to number ( $10^5$  piece) going up of cell at the time of culture start reducing, as for cell which is not introduced in bcl2 gene shown by Comparative Example 7.

It is clear from this result that COS1/bcl2 cell established in Example 8 shows strong apoptosis resistance.

**【0053】**

Experiment 8 Improvement of protein productivity by bcl2 gene introduction  
 COS-1 cell derived from African green monkey is extensively used for expression of recombinant protein, and production. Then, it evaluated about protein productivity at the time of introducing apoptosis inhibitor gene.

**[0054]**

(pcDNA- $\lambda$  のCOS1/bcl2、COS1/vec、及びCOS-1細胞へのトランスフェクション)トランスフェクションの前日に各々の細胞を $5 \times 10^5$  個、直径10cmの培養皿に播種した。10  $\mu$ gのpcDNA- $\mu$ をDEAE-デキストラン法(J. Sambrook, et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)によりトランスフェクションし、4時間炭酸ガス培養器内に放置した。培養上清を吸引し、10%DMSO水溶液5mlを添加して2分間静置後、PBS(一)で2回洗浄した。10%ウシ血清を含むDMEM培地を10ml添加し、一定期間培養した。

**[0055]**

(培養上清液の回収、及び培養上清中の $\lambda$ 鎖蛋白質の定量)pcDNA- $\lambda$ を導入した各々の細胞の培養上清液をトランスフェクションを行なった日を起点として、4、5、6、7、及び14日後に350  $\mu$ lずつ回収した。培養上清液に含まれる $\lambda$ 鎖蛋白質の量はホースラディッシュペルオキシダーゼ(Horse Raddish Peroxidase)標識ヤギ抗マウス $\lambda$ 鎖抗体を用いたELISA法により定量し、4日目の量を1としてその比で表わした。 $\lambda$ 鎖蛋白質の蓄積量は410nm

**[0054]**

(Transfection to COS1 / COS1 [ bcl2 and ]/vec, and COS-1 cell of pcDNA-(lambda))

Each cell was seeded to  $5 \times 10^5$  piece and culture dish with a diameter of 10 cm on previous day of transfection.

PcDNA-micron of 10 microgram is transfected by the DEAE-dextran method (J. Sambrook, et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), it was left in 4-hour carbon-dioxide incubator.

Culture supernatant is sucked, 5 ml of DMSO aqueous solution was added 10%, and it washed twice by PBS (1) after 2-minute Shizutada Hazama.

10 ml of DMEM media which contain cow blood serum 10% is added, fixed period culture was carried out.

**[0055]**

(Recovery of culture supernatant liquid, and fixed quantity of (lambda) strand protein in culture supernatant)

It collected at time 350 microliter of culture supernatant liquids of each cell which introduced pcDNA1 (lambda) 4,5,6,7 and 14 days after with day as the starting point which performed transfection.

Fixed quantity of the amount of (lambda) strand protein contained in culture supernatant liquid is carried out with ELISA method which used horseradish peroxidases (Horse Raddish Peroxidase) label goat anti- mouse (lambda) strand antibody, amount of fourth day was set to

での吸光度で測定した。図9に示されるように、アポトーシス抑制遺伝子であるbcl-2が導入されていない細胞株(比較例7及び比較例8)ではλ鎖蛋白質の蓄積量が7日目以降増加していないのに対して、bcl-2が導入された細胞株(実施例8)では7日目の2倍以上に増加していた。

**[0056]****【発明の効果】**

以上説明したように、本発明による有用物質産生能強化法および細胞により、有用物質産生細胞の生存率が顕著に向上したのみならず、有用物質の生産量ならびに生産速度が、著しく向上した。

**[0057]**

したがって、本発明により提供される方法および細胞を用いて、例えば、種々の抗体を生産するハイブリドーマ、インターフェロン等のサイトカイン類、ワクチン用の抗原物質、遺伝子治療用ウィルスベクター等のその他の有用物質産生細胞への応用が可能である。

**[0058]**

本発明の抗体産生能強化法あるいは細胞は、本実施例で例示したbcl-2のみならず、その他のア

1 and it expressed with the ratio.

Accumulated dose of (lambda) strand protein was measured with absorbance in 410 nm.

As FIG. 9 showed, in cell-strain (Example 8) into which bcl-2 were introduced, it increased to accumulated dose of (lambda) strand protein not increasing after the 7th in cell strain (Comparative Example 7 and Comparative Example 8) into which bcl-2 which are apoptosis inhibitor gene are not introduced more than double on the 7th.

**[0056]****[ADVANTAGE of the Invention]**

As explained above, not only viability rate of useful matter production cell improved notably, but throughput and production rate of useful matter improved remarkably by useful matter production ability strengthening and cell by this invention.

**[0057]**

Therefore, application to useful matter production cell of others, such as cytokine, such as hybridoma which produces various antibody, and interferon, antigenic substance for vaccine, and virus vector for gene therapies, can be performed, using method and cell which are provided by this invention.

**[0058]**

Even if not only bcl-2 that illustrated in this Example but other apoptosis inhibitor gene (Mad/Max, BAG-1, Bcl-XL, Ad.E1b, CrmA etc.)

ポトース抑制遺伝子 (Mad/M ax、BAG-1、Bcl-XL、Ad. E 1b、CrmA等)を使用しても実施あるいは導入が可能であり、その産業上の利用範囲は極めて大きい。

is used for antibody-production ability strengthening or cell of this invention, it can perform implementation or introduction, and utilization range on the industry is very large.

**【図面の簡単な説明】****[BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS]****【図1】**

BCMGSneo-bcl-2の構造を示す図である。

**[FIG. 1]**

It is figure which shows structure of BCMGSneo-bcl -2.

**【図2】**

BCMGSneoの構造を示す図である。

**[FIG. 2]**

It is figure which shows structure of BCMGSneo.

**【図3】**

ウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

**[FIG. 3]**

It is figure which shows result of Western blotting.

**【図4】**

培養時間とハイブリドーマ細胞の生存率との関係を示すグラフである。

**[FIG. 4]**

It is diagrammatic chart which shows concern between culture time and viability rate of hybridoma cell.

**【図5】**

培養時間と培養上清に含まれる抗体濃度との関係を示すグラフである。

**[FIG. 5]**

It is diagrammatic chart which shows concern between culture time and antibody concentration contained in culture supernatant.

**【図6】**

培養期間中一定期間毎の抗体生産速度を測定したグラフである。

**[FIG. 6]**

It is diagrammatic chart which measured antibody production rate for every fixed-among culture period period.



【図7】

pcDNA- $\lambda$ の構造を示す図である。

[FIG. 7]

It is figure which shows structure of pcDNA-(lambda).

【図8】

培養時間と遺伝子導入されたCOS-1細胞の生存数との関係を示すグラフである。

[FIG. 8]

It is diagrammatic chart which shows relation with the number of survival of COS-1 cell by which gene transfer was carried out to culture time.

【図9】

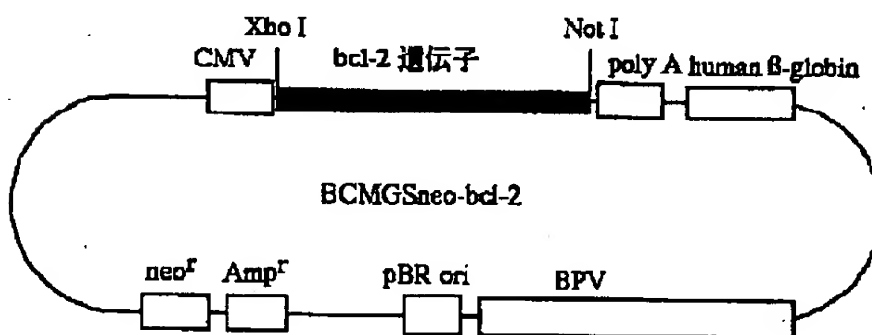
培養期間中一定期間毎の蛋白質の生成蓄積量を測定したグラフである。

[FIG. 9]

It is diagrammatic chart which measured production\_and\_accumulation amount of protein for every fixed-among culture period period.

【図1】

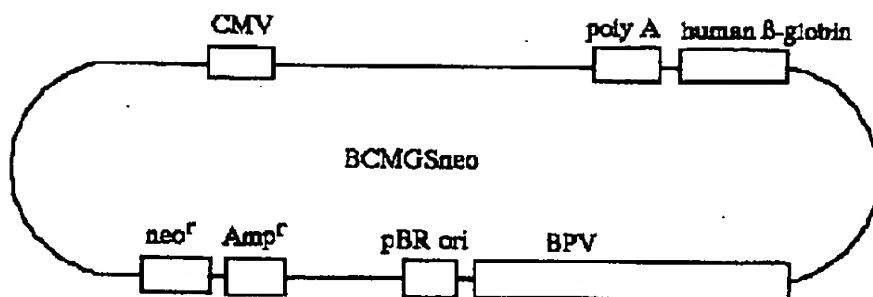
[FIG. 1]



bcl-2 gene

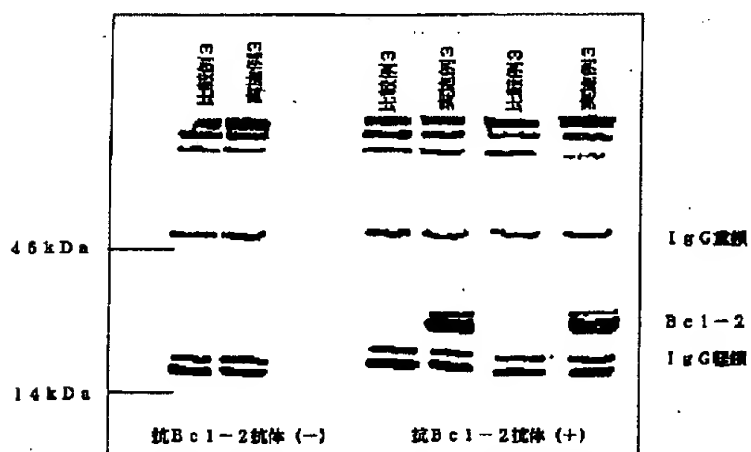
【図2】

[FIG. 2]



【図3】

[FIG. 3]



comparative example 3, example 3, comparative example 3, example 3, comparative example 3,  
 example 3,

IgG heavy chain

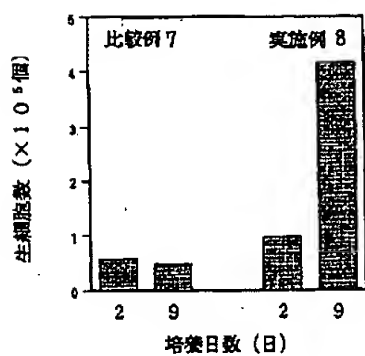
IgG light chain

Anti- Bc1-2 antibody (-)

Anti- bc1-2 antibody (+)

【図8】

[FIG. 8]



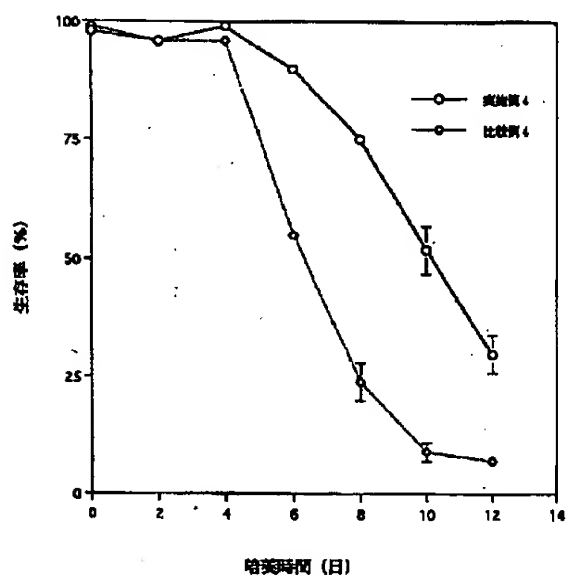
Comparative Example 7      Example 8

Living cell number (x ... pieces)

Period for culture (days)

【図4】

[FIG. 4]



Example 4

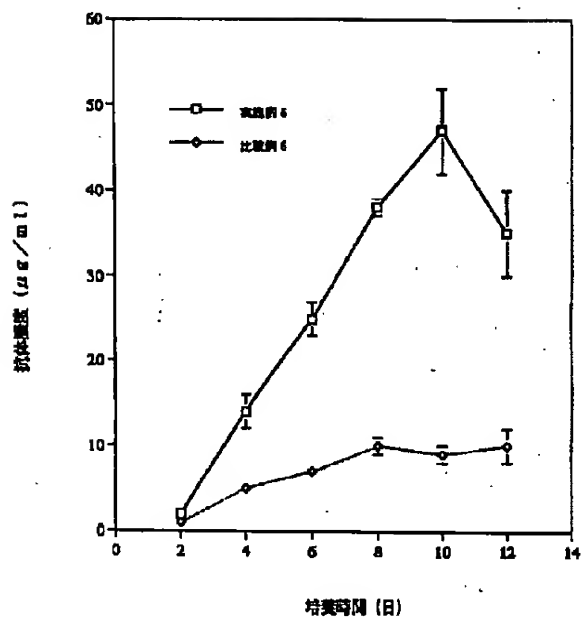
Comparative Example 4

Viability rate

Time for culture (days)

【図5】

[FIG. 5]



Example 5

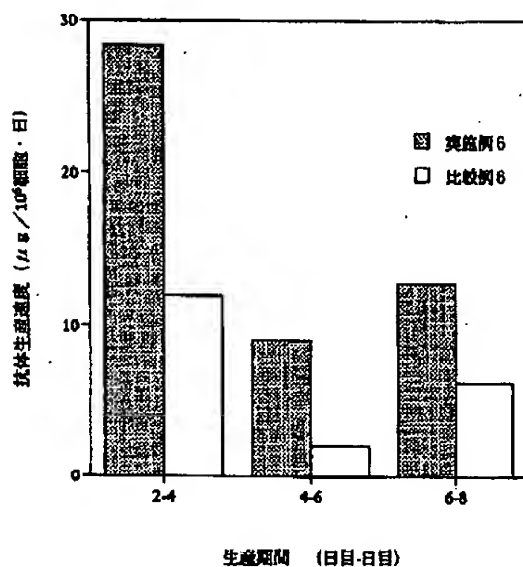
Comparative Example 5

Antibody concentration

Time for culture (days)

【図6】

[FIG. 6]



Example 6

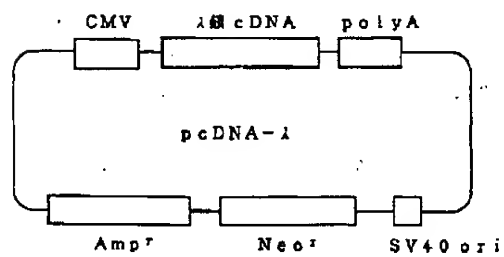
Comparative Example 6

Antibody production rate (...cells/day)

Period of production (day...-day...)

【図7】

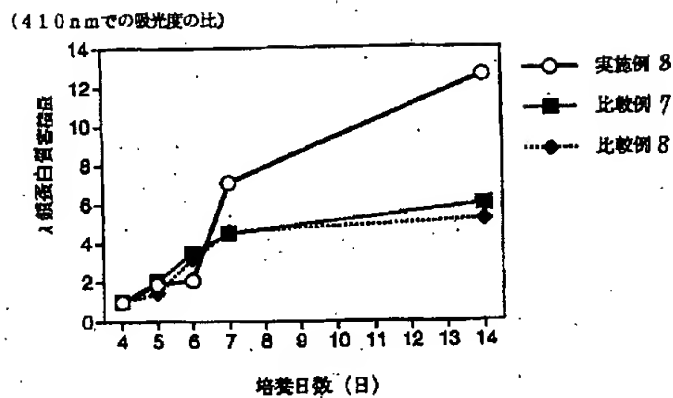
[FIG. 7]



(Lambda) chain c DNA

【図9】

[FIG. 9]



Ratio of absorbance at 410nm

Example 8

Comparative Example 7

Comparative Example 8

Lambda chain protein accumulated dose

Period for culture (days)



## DERWENT TERMS AND CONDITIONS

*Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)